

Ewelina Piąteczak

Autoreferat

**Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi**

Łódź 2016

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- a) **2000.07.17** magister biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. Praca magisterska pt: „Wpływ salicylanów na produkcję alkaloidów indolowych w liściach *Catharanthus roseus*” wykonana w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin. Promotor: prof. dr hab. Henryk Urbanek
- b) **2004.10.22** doktor nauk farmaceutycznych, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca doktorska pt: „*Centaurium erythraea* Rafn w kulturze *in vitro*” wykonana z Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej. Promotor: prof. dr hab. Halina Wysokińska
- c) **2015.02.11** Studia Podyplomowe, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej „Mikrobiologia, higiena i jakość w przemyśle”, praca końcowa pt: „Wybrane chińskie rośliny lecznicze o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych”. Promotor: dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 31.12.2004-28.02.2007** asystent Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu)
- 2.10.2006-30.09.2007** asystent Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 1.11.2007 – obecnie** adiunkt, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

3. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

„Wytwarzanie glikozydów irydoidowych i fenyloetanoidowych w kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Rehmannia*”

Zgłoszona do postępowania habilitacyjnego tematyka obejmuje cykl **ośmiu** publikacji.

b) wykaz publikacji:

L.p.	Publikacja	Punktacja	
		IF	KBN/MNiSW
1.	<p>Piąteczak E*., Królicka A., Wielanek M., Wysokińska H. (2012). Hairy root cultures of <i>Rehmannia glutinosa</i> and the production of iridoid and phenylethanoid glycosides. <i>Acta Physiol Plant</i> 34: 2215-2224.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu eksperymentów, uzyskaniu i hodowli korzeni włósnikowatych, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współudziale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 70%.</i></p>	1,305	25
2.	<p>Piąteczak E*., Grzegorzczuk-Karolak I., Wysokińska H. (2014). Micropropagation of <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.: production of phenolics and flavonoids and evaluation of antioxidant activity. <i>Acta Physiol Plant</i> 36: 1693-1702.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu eksperymentów, hodowli pędów w probówkach i bioreaktorze rozpyłowym, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współudziale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 80%.</i></p>	1,584	25
3.	<p>Piąteczak E*., Kuźma Ł., Sitarek P., Wysokińska H. (2015). Shoot organogenesis, molecular analysis and secondary metabolite production of micropropagated <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. <i>Plant Cell Tiss Org Cult</i> 120: 539-549.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu większości eksperymentów, wyizolowaniu DNA, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współudziale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 70%.</i></p>	2,125	30
4.	<p>Piąteczak E*., Kuźma Ł., Skala E., Żebrowska M., Balcerczak E., Wysokińska H. (2015). Iridoid and phenylethanoid glycoside production and phenotypical changes in plants regenerated from hairy roots of <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. <i>Plant Cell Tiss Org Cult</i> 122: 259-266</p> <p>Erratum: <i>Plant Cell Tiss Organ Cult</i>, 2015, doi 10.1007/s11240-015-0727-1</p>	2,125	30

	<i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu większości eksperymentów, wyizolowaniu DNA, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współdziałale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 70%.</i>		
5.	Piąteczak E* , Kuźma Ł., Porada W., Olas B., Wysokińska H. (2015). Evaluation of antioxidant properties of methanolic extracts from leaves and roots of <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. in human blood. Acta Pol Pharm – Drug Research 72: 777-783. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu eksperymentów, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współdziałale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 50%.</i>	0,737	15
6.	Piąteczak E* , Talar A., Kuźma Ł., Wysokińska H. (2015). Iridoid and phenylethanoid glycoside production in multiple shoots and regenerated <i>Rehmannia elata</i> N.E. Brown ex Prain plants following micropropagation. Acta Physiol Plant 37: 255-262. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i współdziałale w wykonaniu większości eksperymentów, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współdziałale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 80%.</i>	1,584	25
7.	Piąteczak E* , Dębska M., Kontek B., Olas B., Wysokińska H. (2016). The antioxidant properties of methanolic extracts from the shoots and roots of pRi-transformed plants of <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. Acta Pol Pharm – Drug Research 73: 433-438. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu eksperymentów, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współdziałale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 50%.</i>	0,737	15
8.	Piąteczak E* , Kuźma Ł., Wysokińska H. (2016). The influence of methyl jasmonate and salicylic acid on secondary metabolite production in <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. hairy root culture. Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica DOI: 10.1515/abcsb-2016-0004. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji</i>	0,730	20

	pracy, zaplanowaniu i wykonaniu większości eksperymentów, przygotowaniu ekstraktów roślinnych, analizie i interpretacji wyników, łącznie z analizą statystyczną, współudziale w przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 80%.		
Łącznie		10,927	185

* autor korespondencyjny

Wyniki badań opublikowane w publikacjach 1-4 uzyskałam przy finansowym wsparciu z grantu UM w Łodzi praca własna nr 502-13-621 (lata 2007-2010), publikacja 8 została sfinansowana ze środków statutowych Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej (503/3-012-01/503-31-001), a publikacje 5 i 7 były częściowo finansowane z grantu Uniwersytetu Łódzkiego nr 506/1136.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Celem podjętych przeze mnie badań opisanych w pracach zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym było określenie zdolności do wytwarzania glikozydów irydooidowych i fenyloetanoidowych w kulturach *in vitro* chińskiej rośliny leczniczej - *Rehmannia glutinosa* Libosch. oraz innego gatunku z rodzaju *Rehmannia* - *R. elata* N.E. Brown ex Prain. aby ustalić, czy badane kultury mogą stanowić alternatywne źródło surowca o wysokiej zawartości biologicznie aktywnych wtórnych metabolitów. Do badań posłużyły kultury tkankowe (organogeny kalus), kultury organów nietransformowanych (pędów przybyszowych i bocznych oraz korzeni) i transformowanych (pędów i korzeni włóśnikowatych) oraz organy (liście i korzenie) zregenerowanych *in vitro* roślin nietransformowanych i transformowanych *R. glutinosa* oraz kultury pędów bocznych *R. elata*. Zawartość badanych związków porównywałam z zawartością tych związków w liściach i korzeniach roślin uzyskanych metodą konwencjonalną (z nasion). Celem mojej pracy było również zbadanie i porównanie aktywności biologicznej (właściwości przeciwutleniające, przeciwpłytkowe) ekstraktów otrzymanych z roślin uzyskanych z nasion i transformowanych roślin *R. glutinosa* zregenerowanych z korzeni włóśnikowatych.

Wybrane do badań gatunki z rodzaju *Rehmannia* należące do rodziny Orobanchaceae (Angiosperm Phylogeny Group III, 2009) są roślinami endemicznymi występującymi w stanie naturalnym w niektórych prowincjach w Chinach, a dodatkowo są uprawiane na plantacjach w Korei i Japonii. W tradycyjnej i oficjalnej chińskiej medycynie szeroko stosowane jest korzeń *R. glutinosa* (*Rehmanniae Radix*) (Pharmacopoeia of China, 2000). W zależności od sposobu przygotowania korzenia (świeży, suszony lub parzony w winie ryżowym) preparaty z

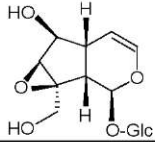
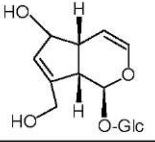
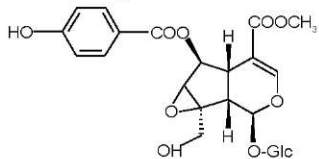
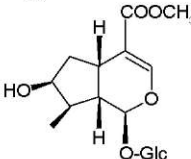
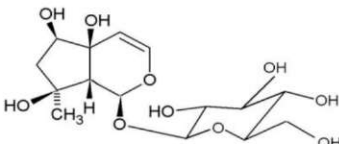
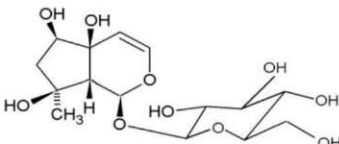
tej rośliny są stosowane w leczeniu różnych schorzeń. Świeży korzeń jest używany w leczeniu krwawień z nosa, bólu gardła, wysypek i wykwitów skórnych oraz jako środek antydiuretyczny w przypadku chorób przebiegających z wysoką gorączką. W tradycyjnej medycynie chińskiej sok ze świeżego korzenia i sproszkowany korzeń podawane w formie tabletek są uważane za eliksir długowieczności, prawdopodobnie ze względu na właściwości przeciwzapalne i oczyszczające organizm z toksyn. Suszony korzeń jest stosowany w przypadku krwimoczu, zaparc, anemii, chorób nerek, cukrzycy, a także w celu rekonwalescencji po zabiegach chirurgicznych. Parzony korzeń jest natomiast używany w chorobach ucha wewnętrznego (Zhang i wsp. 2008; WHO, 1997). Potwierdzono również skuteczność *Rehmanniae Radix* w leczeniu nowotworów, a mechanizm tego działania polega prawdopodobnie na hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych i pobudzaniu apoptozy (Zhang i wsp. 2008). Za lecznicze działanie surowca odpowiadają metabolity wtórne, głównie glikozydy irydoidowe (katalpol, aukubina, katalpozyd), glikozydy fenyloetanolowe (werbaskozyd, izowerbaskozyd) i polisacharydy (rehmannozydy A-D) (Zhang i wsp. 2008). Katalpol jest dominującym irydoidem występującym w kłęczu roślin z rodzaju *Rehmannia*. Zhang i wsp. (2008) uważają, że katalpol (Tabela 1) zawarty w surowcu odpowiada za jego działanie hipoglikemizujące, diuretyczne oraz przeczyszczające. Autorzy Ci podają również, że związek ten wyizolowany ze świeżego korzenia *R. glutinosa* wykazywał także działanie przeciwzapalne, przeciwkrwotoczne oraz wspomagające produkcję hormonów płciowych. Ponadto, katalpol reguluje układ odpornościowy (Liu i wsp. 1992), pobudza angiogenezę w mózgu (Zhu i wsp. 2010) i osłabia apoptozę komórek mózgu po udarze niedokrwiennym (Li i wsp. 2006). Pochodną katalpolu jest katalpozyd (Tabela 1). Jest to ester katalpolu z kwasem p-hydroksybenzoesowym. Związek ten hamuje syntezę tlenku azotu (Oh i wsp. 2002), produkcję czynników prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor- α) (TNF- α), interleukiny-1 β (IL-1 β) oraz interleukiny-6 (IL-6), a także aktywację czynnika jądrowego κ B (NF- κ B) w liniach komórkowych mysich makrofagów RAW 264.7 aktywowanych lipopolisacharydem (An i wsp. 2002).

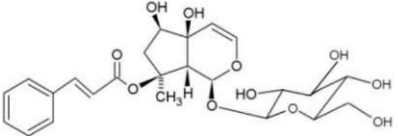
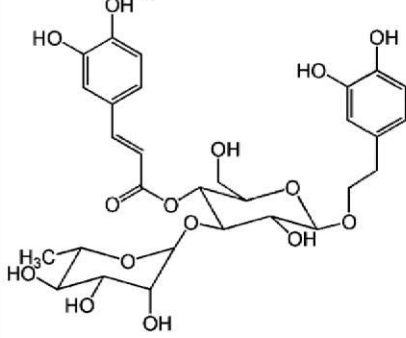
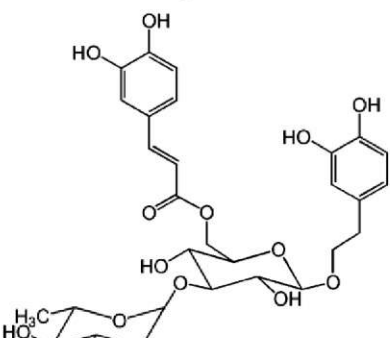
Kolejnym irydoidem występującym w korzeniach roślin z rodzaju *Rehmannia* jest aukubina (Tabela 1), która wykazuje właściwości hepatoprotective po zatruciu α -amanityną, a także hamuje replikację DNA wirusa zapalenia wątroby typu B w doświadczeniach *in vitro* (Chang, 1998). W toku eksperymentów przeprowadzanych na kulturach *in vitro* i zregenerowanych roślinach *R. glutinosa* wchodzących w zakres niniejszego cyklu publikacji po raz pierwszy w rodzaju *Rehmannia* wykryłam i oznaczyłam zawartość dwóch kolejnych glikozydów irydoidowych: harpagidu i harpagozydu (Tabela 1), które są głównymi metabolitami

obecnymi w korzeniu afrykańskiej rośliny leczniczej *Harpagophytum procumbens* (Pedaliaceae). Surowcem leczniczym stanowiącym bogate źródło harpagidu i harpagozydu jest korzeń tej rośliny (*Harpagophyti Radix*), z którego związki te są pozyskiwane do celów leczniczych. Harpagid i harpagozyd wykazują silne właściwości przeciwzapalne, a mechanizm ich działania polega na hamowaniu aktywności dwóch enzymów: cyklooksygenazy-2 (COX-2) i syntazy tlenku azotu indukowanych lipopolisacharydem poprzez hamowanie aktywacji jednego z czynników jądrowych (κ B) (Georgiev, 2013). Ponadto, harpagid wykazuje aktywność przeciwpierwotniakową przeciwko *Laishmania donovani* (Tasdemir i wsp. 2008).

Inną ważną klasę metabolitów wtórnych obecnych w kłączu *R. glutinosa* stanowią glikozydy fenyloetanolowe (werbaskozyd i izowerbaskozyd) (Tabela 1). Werbaskozyd, zwany również akteozydem, orobanchiną lub kutkozydem, wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej, m. in. aktywność przeciwbiałaczkową i cytotoksyczną wobec mysich linii komórkowych białaczki leukocytowej, przeciwzapalną poprzez hamowanie aktywności cyklooksygenazy-2 (COX-2) i hamowanie aktywności dopełniacza w ludzkiej surowicy krwi, działanie diuretyczne, przeciwbakteryjne, antyoksydacyjne i immunosupresyjne (Petit i wsp. 1990; Herbert i wsp. 1991; Pan i wsp. 2003; Pennacchio 2005; Kupeli i wsp. 2007; Shikanga i wsp. 2010; Gyurkovska i wsp. 2011; Kirmizibekmez i wsp. 2012). Izowerbaskozyd wykazuje, podobnie jak werbaskozyd, aktywność przeciwbakteryjną i antyoksydacyjną (Shikanga i wsp. 2010).

Tabela 1. Wzory strukturalne wykrytych i badanych w kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Rehmannia* glikozydów irydooidowych i fenyloetanolowych

glikozydy irydooidowe	<p>katalpol</p> 	<p>aukubina</p> 
	<p>katalpozyd</p> 	<p>loganina</p> 
	<p>harpagid</p> 	<p>harpagozyd</p> 

		
glikozydy fenyloetanoidowe	<p>werbaskozyd</p> 	<p>izowerbaskozyd</p> 

W pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego (**Publikacje 1-8**) wykorzystałam metody biotechnologiczne, molekularne, fitochemiczne, a także badałam metodami *in vitro* aktywność biologiczną ekstraktów z kultur i roślin *R. glutinosa* i *R. elata*. Przeprowadzone badania obejmowały cztery zagadnienia:

1. uzyskanie kultur *in vitro* (kultury kalusowe, kultury pędów przybyszowych, kultury pędów bocznych, korzenie transformowane) i regenerację nietransformowanych i transformowanych roślin z rodzaju *Rehmannia*. Przy użyciu metod molekularnych: RAPD (ang. random amplified polymorphic DNA) oraz ISSR (ang. inter simple sequence repeat) określiłam poziom zmienności w roślinach zregenerowanych z tkanki kalusowej, a metodę PCR (ang. polymerase chain reaction) wykorzystałam do potwierdzenia procesu transformacji w korzeniach włósnikowatych i roślinach transformowanych *R. glutinosa*
2. identyfikacja i określenie zawartości wybranych glikozydów irydoidowych i fenyloetanoidowych w materiale roślinnym uzyskanym metodami *in vitro* oraz porównanie zawartości badanych metabolitów z zawartością tych związków w liściach i korzeniach roślin otrzymanych z nasion
3. próby zwiększenia zawartości badanych związków w kulturze korzeni włósnikowatych poprzez elicytację jasmonianem metylu i kwasem salicylowym

4. badania aktywności biologicznej metanolowych ekstraktów uzyskanych z materiału roślinnego otrzymanego metodami biotechnologicznymi (korzenie i pędy zregenerowanych *in vitro* roślin transformowanych) oraz korzenie i pędy roślin uzyskanych z nasion.

Wprowadzenie w tematykę badawczą publikacji zgłoszonych w postępowaniu habilitacyjnym

Rośliny są źródłem wielu aktywnych biologicznie substancji, które są stosowane w terapii wielu chorób. Związki izolowane z roślin są również stosowane jako naturalne barwniki, środki zapachowe, dodatki do żywności, pestycydy. Jednakże, pozyskiwanie cennych metabolitów z roślin rosnących w gruncie nie jest łatwe ze względu na wiele ograniczeń wynikających z powolnego tempa wzrostu niektórych roślin, występowania tylko w określonych strefach klimatycznych, czy ochrony prawnej gatunków. Ponadto, zawartość metabolitów wtórnych w różnych organach roślin jest na ogół niska i może się zmieniać w zależności od metody i pory zbioru, suszenia, warunków klimatycznych (Turowska, 1980). Dlatego też coraz częściej obserwuje się wprowadzenie roślin do upraw, a także pozyskiwanie związków naturalnych z kultur *in vitro*. Kultury *in vitro* oznaczają hodowle protoplastów, komórek, tkanek lub całych organów roślinnych (korzenie, pędy) na podłożach o ściśle określonym składzie, w kontrolowanych, powtarzalnych, sterylnych warunkach. Produkcja metabolitów wtórnych na dużą skalę w bioreaktorach z wykorzystaniem roślinnych kultur *in vitro* posiada szereg zalet w porównaniu z uprawami roślin na plantacjach. Zaletami roślinnych kultur tkankowych są ścisła kontrola i optymalizacja procesów biosyntezy, uniezależnienie od warunków klimatycznych i możliwość ciągłego pozyskiwania produktów o wysokiej jakości. Możliwe jest również wprowadzenie do kultury *in vitro* tkanek lub organów bezpośrednio związanych z produkcją danego metabolitu (Shilpa i wsp. 2010; Vijaya Sree i wsp. 2010). Kultury komórek, tkanek, organów lub całe zregenerowane *in vitro* rośliny mogą produkować związki na wyższym poziomie niż roślina w gruncie (Estrada-Zúñiga i wsp. 2009; Stancheva i wsp. 2011; Gómez-Aquirre i wsp. 2012), a czasem istnieje też możliwość pozyskiwania nowych produktów, które nie występują w roślinach z gruntu (Vijaya Sree i wsp. 2010). Ostatnio coraz popularniejsze stało się prowadzenie kultur komórkowych i/lub organów w bioreaktorach, które pozwalają na prowadzenie procesów ciągłych w ściśle kontrolowanych warunkach (Wysokińska i Chmiel 2006). Zwiększenie wydajności produkcji metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* można osiągnąć poprzez optymalizację warunków hodowli, dobór odpowiednich regulatorów wzrostu,

selekcję wysokoproduktywnych linii, elicytację, suplementację prekursorami, transformację genetyczną (Giri i Narasu 2000; Shilpa i wsp. 2010; Vijaya Sree i wsp. 2010).

Roślinne kultury *in vitro* są również wykorzystywane do mikrorozmnażania, które pozwala na zwiększenie współczynnika mnożenia roślin, uniezależnienia od czynników środowiskowych, rozmnażanie roślin nie wytwarzających nasion, chronionych lub endemicznych (Malepszy 2004). Proces mikrorozmnażania obejmuje mnożenie pędów, ich ukorzenianie i aklimatyzację roślin w glebie. Na etapie mnożenia i ukorzeniania pędów konieczne jest zastosowanie podłoży wzbogaconych w odpowiednie regulatory wzrostu (cytokininy i/lub auksyny), które będą hamować dominację wierzchołkową, a tym samym stymulować powstawanie nowych pędów bocznych (mnożenie pędów) lub będą stymulować wydłużanie się szczytowej części pędu i tworzenie korzeni (ukorzenianie).

Ad. 1 Badania biotechnologiczne

Kultury *in vitro* roślin z rodzaju *Rehmannia*

W toku eksperymentów wchodzących w zakres prac przedstawionych w niniejszym postępowaniu habilitacyjnym otrzymałam kultury *in vitro* *R. glutinosa* (kalusowa, pędów przybyszowych, pędów bocznych, korzeni transformowanych i pędów transformowanych) (**Publikacje 1-4**). Z pędów bocznych i przybyszowych *R. glutinosa* zregenerowałam całe rośliny. Opracowałam również proces mikrorozmnażania *R. elata* z pąków bocznych (**Publikacja 6**).

Mikrorozmnażanie roślin z rodzaju *Rehmannia*

Opracowałam i opisałam procedury efektywnego mikrorozmnażania *R. glutinosa* zarówno poprzez indukcję pąków i pędów bocznych z pąka szczytowego (**Publikacja 2**), jak i drogą organogenezy pośredniej poprzez indukcję pąków przybyszowych z tkanki kalusowej (**Publikacja 3**). Pierwszym etapem prac z kulturami *in vitro* *R. glutinosa* było mikrorozmnażanie tego gatunku poprzez indukcję pąków i pędów przybyszowych z kalusa uzyskanego z różnych eksplantatów (liścienie, hypokotyle i korzenie) pochodzących z siewek (**Publikacja 3**). Częstość indukcji pędów przybyszowych i liczbę pędów przypadającą na jeden eksplantat oceniałam na podłożu agarowym Murashige i Skooga (MS) (Murashige i Skoog 1962) uzupełnionym 0,2 – 3,0 mg·L⁻¹ BAP pojedynczo lub w kombinacji z auksyną (0,1 mg·L⁻¹ kwasem indolilo-3-octowym - IAA lub 1-naftalenoctowym - NAA). Najwyższą odpowiedź, gdzie 90% eksplantatów tworzyło organogeny kalus ze średnio 9 pędami

przybyszowymi, uzyskałam na eksplantatach pochodzących z hypokotyli, hodowanych na podłożu MS wzbogaconym $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP oraz $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA po 6 tygodniach hodowli. Uzyskane pędy ukorzeniałam w ciągu kolejnych 6 tygodni na podłożu MS bez regulatorów wzrostu, bądź wzbogaconym auksyną (IAA lub kwasem indolilo-3 masłowym - IBA). Uzyskane rośliny aklimatyzowałam w warunkach *ex vitro* w szklarni, a następnie przenosiłam do ogrodu. Otrzymany kalus zachowywał zdolność do regeneracji pąków przybyszowych przez 4 lata (**Publikacja 3**).

Procedurę efektywnej regeneracji roślin z wierzchołkowych części pędów opracowałam również dla drugiego badanego gatunku – *R. elata* (**Publikacja 6**). Kulturę pędów bocznych uzyskałam poprzez namnażanie wierzchołkowych części pędów na agarowym podłożu MS uzupełnionym $0,57 \mu\text{M}$ IAA i różnymi stężeniami ($2 - 8 \mu\text{M}$) BAP, kinetyny lub 2-isopentenyloadeniny (2iP). Najwyższy współczynnik mnożenia (9 pędów i pąków bocznych na eksplantat po 4 tygodniach hodowli) osiągnęłam na podłożu MS uzupełnionym IAA i 2iP ($6 \mu\text{M}$). Wszystkie pędy ukorzeniały się tworząc średnio 7.9 korzeni o średniej długości około 3 cm po 4 tygodniach hodowli na podłożu MS o zredukowanej do połowy ilości makro- i mikroelementów ($\frac{1}{2}$ MS) z dodatkiem $0.57 \mu\text{M}$ IBA. Ukorzone pędy aklimatyzowałam w doniczkach z ziemią przez 4 tygodnie, a następnie przenosiłam do ogrodu. Przy zastosowaniu do mikrorozmnażania opisaną procedurę możliwe jest uzyskanie po 3 cyklach namnażania i 3 cyklach ich ukorzenia aż 750 roślin *R. elata* z jednego eksplantatu (**Publikacja 6**).

Badania molekularne

Kultury *in vitro*, a zwłaszcza tkanka kalusowa po długotrwałym okresie pasażowania, są narażone na niekorzystne zmiany na poziomie genetycznym i epigenetycznym, zwane zmiennością somaklonalną (Larkin i Snowcroft 1981). Zastosowane metody molekularne: RAPD oraz ISSR pozwalają na określenie genetycznej stabilności regenerantów w porównaniu z materiałem kontrolnym. Przeprowadzone przeze mnie badania zostały zastosowane w celu porównania profilu genetycznego wybranego fragmentu DNA roślin *R. glutinosa* zregenerowanych z organogennej tkanki kalusowej po długotrwałym okresie pasażowania (4 lata), z roślinami pochodzącymi z nasion. Do analizy RAPD wybrałam pięć primerów, a do analizy ISSR wybrałam 8 primerów, które po reakcji PCR z DNA wyizolowanym z kontrolnych roślin *R. glutinosa* dawały policzalne prążki na żelu agarozowym. Nie stwierdziłam różnic w liczbie ani położeniu prążków na żelu między DNA wyizolowanym z roślin zregenerowanych z tkanki kalusowej, a tymi wyhodowanymi z nasion

przy zastosowaniu wybranych primerów zarówno w metodzie RAPD jak i ISSR. Rezultaty tej części eksperymentów zostały zawarte w **Publikacji 3**. W moich badaniach nad kulturą kalusową *R. glutinosa* stwierdziłam również jej dużą stabilność, zarówno pod względem molekularnym jak i zdolności do regeneracji pędów przez okres 4 lat (**Publikacja 3**).

Kolejnym etapem prac było namnażanie *R. glutinosa* z pąków szczytowych i określenie wpływu trzech cytokinin (6-benzyloaminopuryny - BAP, tidiazuronu - TDZ oraz kinetyny) na zdolność eksplantatów do tworzenia pąków bocznych. Wyniki zostały opisane w **Publikacji 2**. Stwierdziłam, że najefektywniejszą kombinacją regulatorów wzrostu w podłożu MS było 0,1 mg L⁻¹ IAA w połączeniu z 1,0 mg L⁻¹ BAP dając średnio 8,2 pędy boczne na eksplantat po 4 tygodniach hodowli w szklanych probówkach. Wyższy współczynnik mnożenia (21 pędów bocznych na eksplantat) uzyskałam namnażając pędy boczne w bioreaktorze rozpyłowym. Do czasu publikacji wyników moich badań, w literaturze nie było doniesień o kulturach bioreaktorowych roślin z rodzaju *Rehmannia*. Namnożone w bioreaktorze pędy ukorzeniały się z 93% częstością po 6 tygodniach hodowli na agarowym podłożu MS uzupełnionym auksyną IAA (0,1 mg L⁻¹), a uzyskane rośliny aklimatyzowałam do warunków *ex vitro* uzyskując rośliny fenotypowo identyczne z roślinami otrzymanymi z nasion (**Publikacja 2**).

Transformacja genetyczna *R. glutinosa*

W toku kolejnych doświadczeń z zakresu kultur *in vitro* roślin z rodzaju *Rehmannia* przeprowadziłam genetyczną transformację *R. glutinosa* przy pomocy bakterii *Agrobacterium rhizogenes* celem otrzymania kultur korzeni transformowanych. Wyniki tej części eksperymentów zostały opublikowane w 2012 roku (**Publikacja 1**). Korzenie transformowane, zwane również włóśnikowatymi powstają w wyniku zakażenia fragmentów roślin glebową bakterią *Agrobacterium rhizogenes*. Te Gram ujemne pałeczki mają naturalną zdolność do kolonizacji tkanek roślinnych i wbudowywania fragmentu swojego plazmidu Ri (T-DNA) do genomu roślinnego (Wysokińska i Chmiel 2006). Ekspresja zawartych w tym fragmencie DNA genów *rol* (a, b, c, d) prowadzi do powstania na eksplantacie korzeni przybyszowych. Jednocześnie ekspresja genów *rol* zmienia metabolizm rośliny, co może prowadzić do zmiany profilu syntetyzowanych przez roślinę związków. Korzenie włóśnikowate charakteryzują się dużą stabilnością genetyczną i biochemiczną, co czyni je efektywnym źródłem wtórnych metabolitów, szczególnie tych akumulowanych w korzeniach rośliny macierzystej (Wysokińska i Chmiel 2006). W moich pracach przeprowadziłam transformację fragmentów pędów i liści pochodzących z kultury pędów *R. glutinosa*

szczeniem A4 *Agrobacterium rhizogenes*. W wyniku transformacji uzyskałam 40 linii korzeni transformowanych, spośród nich na podstawie morfologii korzeni i przyrostu biomasy wyselekcjonowałam 10 linii. Korzenie włóśnikowate hodowałam w płynnym podłożu Woody Plant (WPM) (Lloyd i Mc Cown 1980) oraz podłożu ½ B5 (Gamborg i wsp. 1968). Stwierdzono, że wzrost korzeni w testowanych liniach zależał od zastosowanego podłoża. W płynnym podłożu WPM po 4 tygodniach hodowli korzenie wykazywały 1,8 - 4,5-krotnie wyższe przyrosty świeżej i 2 - 4,4-krotnie wyższe przyrosty suchej masy w porównaniu z podłożem ½ B5. Proces transformacji został potwierdzony w badanych liniach na poziomie molekularnym za pomocą reakcji PCR z wykorzystaniem specyficznych primerów dla *rolB* i *rolC* (**Publikacja 1**).

W toku dalszych eksperymentów zaobserwowałam zjawisko spontanicznej regeneracji pędów przybyszowych na korzeniach włóśnikowatych *R. glutinosa*, hodowanych w płynnym podłożu WPM w ciemności (**Publikacja 4**). Pędy namnażałam na agarowym podłożu MS wzbogaconym 1,0 mg·L⁻¹ BAP oraz 0,1 mg·L⁻¹ IAA w 300 mL szklanych słoikach i w płynnym podłożu MS w 5-litrowym bioreaktorze rozpyłowym uzyskując współczynniki mnożenia, odpowiednio 17 i 28 pędów na eksplantat. Namnożone pędy ukorzeniałam na agarowym podłożu MS zawierającym IAA lub IBA w ciągu 4 tygodni. Ukorzenione pędy przenosiłam do doniczek z ziemią i aklimatyzowałam w szklarni. Proces transformacji w zregenerowanych roślinach został potwierdzony za pomocą reakcji PCR oraz RT-PCR (ang. reverse-transcriptase polymerase chain reaction). W transformowanych roślinach nie zaobserwowałam typowych zmian określanych jako syndrom włóśnikowatości, tj. skrócone międzywęzła, karłowaty pokrój, pomarszczone liście. Rośliny transformowane charakteryzowały się większą biomasa części nadziemnej i systemu korzeniowego z licznymi i dłuższymi odgałęzieniami bocznymi niż rośliny nietransformowane (**Publikacja 4**).

Ad. 2 Badania fitochemiczne

Celem kolejnego etapu badań była identyfikacja i określenie zawartości wybranych glikozydów irydooidowych i glikozydów fenyloetanoloidowych w metanolowych ekstraktach uzyskanych z organogennego kalusa, kultury pędów bocznych, pędów i korzeni zregenerowanych roślin nietransformowanych i transformowanych, kultury korzeni transformowanych *R. glutinosa*, a także z kultury pędów bocznych, liści oraz korzeni zregenerowanych *in vitro* roślin *R. elata* (**Publikacje 1, 3-6**). Identyfikacji badanych związków dokonałam na podstawie porównania czasów retencji, widm UV i widm masowych

badanych próbek i związków wzorcowych metodą HPLC-ESI-MS. Dokładny opis metod i wyników dotyczących identyfikacji badanych związków zawarłam w **Publikacjach 1 i 3**. W oparciu o zastosowane metody identyfikacji stwierdziłam w badanym materiale obecność glikozydów irydooidowych: katalpolu, aukubiny, loganiny, katalpozydu, harpagidu i harpagozydu oraz dwóch glikozydów fenoloetanoidowych: werbaskozydu i izowerbaskozydu. Zawartość tych związków określiłam za pomocą metody HPLC (ang. high pressure liquid chromatography) (**Publikacja 1**) oraz UHPLC (ang. ultra high pressure liquid chromatography) (**Publikacje 3-6, 8**). Do czasu publikacji wyników moich badań w literaturze brak było doniesień o obecności harpagidu i harpagozydu w roślinach z rodzaju *Rehmannia*. Określiłam również metodami spektrofotometrycznymi, całkowitą zawartość związków fenolowych i flawonoidów w liściach i korzeniach roślin *R. glutinosa* zregenerowanych *in vitro* (**Publikacja 2**). Zawartość wszystkich badanych związków porównałam z ilościami tych metabolitów w kulturze korzeni nietransformowanych oraz w liściach i korzeniach roślin *R. glutinosa* (**Publikacje 1-5**) lub *R. elata* (**Publikacja 6**) pochodzących z nasion.

W organogennym kalusie i zregenerowanych *in vitro* roślinach *R. glutinosa* zidentyfikowałam katalpol, aukubinę, harpagid, harpagozyd, werbaskozyd i izowerbaskozyd, a w śladowych ilościach występowały loganina i katalpozyd. Stwierdziłam, że najwyższe ilości aukubiny (0,8 - 0,9 mg·g⁻¹ suchej masy), harpagidu (0,4 - 0,5 mg·g⁻¹ suchej masy), werbaskozydu (12,2 - 12,8 mg·g⁻¹ suchej masy) i izowerbaskozydu (3,1 - 3,3 mg·g⁻¹ suchej masy) akumulowały się tkance kalusowej, podczas gdy zregenerowane z tej tkanki *in vitro* rośliny charakteryzowały się najwyższymi poziomami katalpolu (43 - 45 mg·g⁻¹ suchej masy) i harpagozydu (0,1 mg·g⁻¹ suchej masy). Stwierdziłam, że zawartości harpagidu, werbaskozydu i izowerbaskozydu w organogennym kalusie były 2 - 6-krotnie wyższe, a aukubiny nawet 26-krotnie wyższe niż w roślinach pochodzących z nasion (**Publikacja 3**).

W toku dalszych fitochemicznych badań określiłam zawartość całkowitą związków fenolowych i flawonoidów w metanolowych ekstraktach pochodzących z liści i korzeni zregenerowanych *in vitro* roślin *R. glutinosa* po 10 tygodniach hodowli w glebie (**Publikacja 2**). Stwierdziłam, że najwyższą zawartością związków fenolowych charakteryzowały się ekstrakty z liści *R. glutinosa*. Liście roślin zregenerowanych *in vitro* akumulowały mniej związków fenolowych (58,7 mg·g⁻¹ w przeliczeniu na kwas galusowy) niż liście roślin pochodzących z nasion (76,3 mg·g⁻¹ w przeliczeniu na kwas galusowy). Z drugiej strony,

ekstrakty z liści z roślin zregenerowanych *in vitro* akumulowały wyższe ilości flawonoidów (19,2 mg·g⁻¹ w przeliczeniu na kwercetynę) niż liście roślin pochodzących z nasion (15 mg·g⁻¹ w przeliczeniu na kwercetynę) (**Publikacja 2**).

Zawartość czterech glikozydów irydoidowych (katalpolu, aukubiny, loganiny i katalpozydu) oraz dwóch glikozydów fenoloetanoidowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu) określiłam w 10 liniach korzeni włośnikowatych *R. glutinosa* (**Publikacja 1**). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że produkcja metabolitów w korzeniach zależała od zastosowanego podłoża. Wysokowydajne linie korzeni produkowały 4-krotnie wyższe ilości loganiny, 3,2 - 4-krotnie więcej katalpozydu, 2,6 - 3,5-krotnie więcej werbaskozydu i izowerbaskozydu w porównaniu z kulturą nietransformowanych korzeni tego gatunku i korzeniami rocznych roślin rosnących w gruncie, wyhodowanych z nasion. Najwyższe ilości katalpozydu i loganiny w transformowanych korzeniach wynosiły odpowiednio 4,45 mg·g⁻¹ suchej masy (linia RS-2) i 4,66 mg·g⁻¹ suchej masy (linia RS-1). Aukubina i katalpol były wykryte w kilku liniach korzeni, jednakże ich ilości były śladowe. Najwyższe zawartości werbaskozydu (16,9 mg·g⁻¹ suchej masy) i izowerbaskozydu (3,46 mg·g⁻¹ suchej masy) wykryto w linii korzeni RS-2 (**Publikacja 1**). Stwierdziłam, że proces transformacji *R. glutinosa* był korzystny dla zwiększenia produkcji większości spośród badanych metabolitów wtórnych. W korzeniach roślin rosnących w gruncie nie wykryto loganiny ani aukubiny, jednakże katalpol w korzeniach nietransformowanych był produkowany w wyższych ilościach niż w korzeniach transformowanych (**Publikacja 1**).

Przedmiotem badań fitochemicznych były również kultury pędów i zregenerowane *in vitro* 4-miesięczne rośliny *R. elata* (**Publikacja 6**). Zaobserwowałam różnice w produkcji wtórnych metabolitów w zależności od analizowanego materiału roślinnego. W namnożonych *in vitro* pędach stwierdziłam obecność harpagidu, werbaskozydu i izowerbaskozydu. Pędy charakteryzowały się 12,6-krotnie wyższą zawartością harpagidu niż zregenerowane rośliny, ale z drugiej strony około 2,7-krotnie niższą zawartością werbaskozydu i izowerbaskozydu. Dodatkowo w namnożonych *in vitro* pędach nie stwierdziłam obecności katalpolu, który występował w całych roślinach. Najwyższym stężeniem katalpolu (10,4 mg·g⁻¹ suchej masy) charakteryzowały się liście zregenerowanych roślin. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdziłam, że otrzymana kultura pędów *R. elata* jak również zregenerowane rośliny mogą być efektywnym źródłem biologicznie aktywnych irydoidów (katalpolu, harpagidu) oraz glikozydów fenoloetanoidowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu) (**Publikacja 6**).

W dalszym etapie mojej pracy określiłam zawartość badanych wcześniej glikozydów irydoidowych i fenyloetanoloidowych w pędach transformowanych zregenerowanych na korzeniach włośnikowatych oraz w organach (liściach i korzeniach) transformowanych roślin *R. glutinosa* po 6 i 12 miesiącach wzrostu w glebie (**Publikacja 4**). Stwierdziłam, że kultura transformowanych pędów była zdolna do syntetyzowania katalpolu, werbaskozydu i izowerbaskozydu, ale zawartości tych związków były niskie i wynosiły odpowiednio 1,7 - 4,9 mg·g⁻¹ suchej masy; 7,6 - 10,5 mg·g⁻¹ suchej masy; 0,6 mg·g⁻¹ suchej masy. Liście i korzenie transformowanych roślin akumulowały podobne ilości izowerbaskozydu, wyższe ilości katalpozydu, aukubiny, katalpolu, harpagidu i werbaskozydu oraz niższe ilości harpagozydu i loganiny niż liście i korzenie roślin nietransformowanych. Zawartość ww. związków różniła się w zależności od wieku roślin i analizowanego organu. Jednakże, wyższa biomasa pędów i korzeni roślin transformowanych dawała wyższą produktywność (w przeliczeniu na roślinę) wszystkich analizowanych związków w genetycznie zmienionych roślinach (**Publikacja 4**).

Ad. 3. Elicytacja korzeni włośnikowatych *R. glutinosa*

Biosynteza wielu wtórnych metabolitów w roślinach jest zwykle reakcją obronną na różnego rodzaju warunki stresowe. Wiele elicytorów, np. kwas jasmonowy, jasmonian metylu (MeJa) lub kwas salicylowy (SA) działają jako roślinne cząsteczki wywołujące transdukcję sygnałów w komórce roślinnej (Chetana i Ramawat 2009; d'Onofrio i wsp. 2009), co w efekcie stymuluje reakcje biochemiczne zaangażowane w tworzenie niskocząsteczkowych obronnych składników w roślinach na przykład w odpowiedzi na atak patogenów (Ozawa i wsp. 2000; Schenk i wsp. 2000). Egzogenny dodatek takich elicytorów do roślinnych kultur lub roślin stymuluje biosyntezę wielu grup metabolitów wtórnych, np. glukozynolanów, terpenoidów, fenylopropanoidów, saponin i alkaloidów (Van der Fits i Memelink 2000; Memelink i wsp. 2001; de Costa i wsp. 2013; Russowski i wsp. 2013). Jednakże, elicytacja jest bardzo złożonym procesem zależnym od wielu czynników, takich jak rodzaj i stężenie elicytora, stadium wzrostu kultury lub rośliny, moment wprowadzenia elicytora oraz czas ekspozycji na elicytor (Namdeo 2007). Te warunki muszą być odpowiednio dobrane do każdej kultury i do typu metabolitów wtórnych. Wyniki eksperymentów poświęconych elicytacji kultury korzeni włośnikowatych *R. glutinosa* zostały opisane w **Publikacji 8**. We wspomnianej pracy określiłam wpływ SA i MeJa dodawanych pojedynczo lub łącznie na produkcję biomasy i zawartość glikozydów irydoidowych (katalpolu, harpagidu i katalpozydu) oraz glikozydów fenyloetanoloidowych (werbaskozydu i izowerbaskozydu) w korzeniach włośnikowatych. Określiłam również optymalne stężenie

elicytora oraz czas ekspozycji na elicytor. Elicytory (MeJa lub SA) dodawałam do 23-dniowych kultur w stężeniach od 50 do 200 μM (oddzielnie) lub łącznie (MeJa + SA) w stężeniach 50 i 100 μM . Korzenie włośnikowate analizowałam 72 i 120 godzin po elicytacji. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że rodzaj elicytora, jego stężenie i czas ekspozycji silnie wpływały na zawartość każdego z analizowanych metabolitów. 72-godzinne traktowanie 200 μM MeJa okazało się najbardziej korzystne dla zawartości werbaskozydu (10-krotnie więcej) i izowerbaskozydu (6,4-krotnie więcej) niż w korzeniach nie poddanych elicytacji (kontrola). Z kolei elicytacja 150 μM MeJa przez 72 godziny okazała się najefektywniejsza dla zwiększenia zawartości harpagidu (7.5-krotnie więcej), a 120-godzinna elicytacja tym samym stężeniem MeJa zwiększyła zawartość katalpolu (prawie 2-krotnie) w porównaniu z kontrolą. MeJa i SA zastosowane łącznie również zwiększały poziom badanych metabolitów w porównaniu z kontrolą, chociaż ich zawartości były niższe niż te obserwowane, kiedy MeJa był dodany oddzielnie w optymalnym stężeniu. Stwierdziłam także, że w przypadku korzeni włośnikowatych *R. glutinosa* MeJa okazał się bardziej efektywnym elicytorem niż SA (**Publikacja 8**).

Ad. 4. Badania aktywności biologicznej

W toku dalszych prac doświadczalnych określiłam niektóre właściwości biologiczne (przeciwutleniające, przeciwpłytkowe) metanolowych ekstraktów z liści i korzeni roślin nietransformowanych uzyskanych *in vitro* (**Publikacje 2, 5**) oraz roślin transformowanych zregenerowanych z korzeni włośnikowatych uzyskanych po zakażeniu wierzchołkowych części pędów *R. glutinosa* glebową bakterią *Agrobacterium rhizogenes* (szczep A4) (**Publikacja 7**) i właściwości te porównałam z właściwościami metanolowych ekstraktów z liści i korzeni roślin *R. glutinosa* rosnących w gruncie, wyhodowanych metodą konwencjonalną (z nasion).

W **Publikacji 2** określiłam aktywność antyoksydacyjną metanolowych ekstraktów z liści i korzeni zregenerowanych *in vitro* roślin *R. glutinosa* hodowanych w szklarni czterema testami *in vitro*: dwoma testami zmiatania wolnych rodników (DPPH i ABTS), testem redukcji jonów żelazowych (FRAP) i całkowitej aktywności antyoksydacyjnej w teście molibdenianowym. We wszystkich badanych przypadkach, metanolowe ekstrakty z liści wykazywały silniejszą antyoksydacyjną aktywność niż ekstrakty z korzeni. Stwierdziłam również, że istnieje silna korelacja pomiędzy całkowitą zawartością związków fenolowych i flawonoidów, a aktywnością antyoksydacyjną badanych ekstraktów (**Publikacja 2**).

W **Publikacjach 5 i 7** przetestowałam metanolowe ekstrakty z liści i korzeni roślin *R. glutinosa* (transformowanych i nietransformowanych, zregenerowanych *in vitro*) przeciwko zniszczeniom indukowanym przez stres oksydacyjny w ludzkim osoczu i płytkach krwi. Stres oksydacyjny był indukowany za pomocą nadtlenu wodoru (H_2O_2) oraz H_2O_2/Fe . W doświadczeniach opisanych w **Publikacji 5** zbadalam poziom biomarkera peroksydacji lipidów – tworzenia reaktywnych produktów kwasu tiobarbiturowego (TBARS), który znacząco obniżał się po zastosowaniu metanolowego ekstraktu z liści nietransformowanych roślin *R. glutinosa* (**Publikacja 5**).

Określiłam również aktywność antyoksydacyjną metanolowych ekstraktów z liści i korzeni transformowanych roślin *R. glutinosa* (**Publikacja 7**). Aktywność określiłam poprzez zmierzenie zdolności ekstraktów do hamowania tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) i produkcji TBARS w płytkach krwi nie aktywowanych i aktywowanych trombiną. Najwyższy procent hamowania tworzenia $O_2^{\cdot-}$ (42,5%) wykazywały ekstrakty pochodzące z liści transformowanych roślin (50 $\mu g/mL$) w płytkach krwi aktywowanych trombiną (**Publikacja 7**). W opisywanej publikacji zbadalam również właściwości antyoksydacyjne badanych ekstraktów z liści i korzeni transformowanych roślin *R. glutinosa* przeciwko peroksydacji lipidów w osoczu krwi ludzkiej indukowanej przez H_2O_2 i H_2O_2/Fe . Zaobserwowałam, że po 15 minutowej preinkubacji płytek krwi z badanymi ekstraktami, ilość TBARS w płytkach nieaktywowanych i aktywowanych trombiną obniżyła się o około 44% w obecności ekstraktu z liści i o około 55% w obecności ekstraktu z korzeni transformowanych roślin *R. glutinosa* (**Publikacja 7**). Wyniki przedstawione w opisywanej publikacji wskazują, że metanolowe ekstrakty z transformowanych roślin *R. glutinosa* mogą być obiecującym źródłem naturalnych antyoksydantów, które mogą być wykorzystane w leczeniu różnych chorób układu krwionośnego. Badane ekstrakty mogą również chronić lipidy przed niekorzystnymi modyfikacjami spowodowanymi stresem oksydacyjnym.

4. Najważniejsze osiągnięcia

Najważniejszym osiągnięciem naukowym zaprezentowanym w niniejszym opracowaniu było wykrycie w kulturach *in vitro*, w całych zregenerowanych roślinach *R. glutinosa* i *R. elata* oraz w roślinach pochodzących z nasion dwóch glikozydów irydooidowych: harpagidu i harpagozydu, dotychczas nie wykrytych w rodzaju *Rehmannia*. W ten sposób rośliny te dołączyły do przedstawicieli rodziny Pedaliaceae, Orobanchaceae i Scrophulariaceae produkujących te ważne dla lecznictwa irydoidy o działaniu p/zapalnym. Szczególnie wysokoproduktywną kulturą w odniesieniu do produkcji harpagidu okazała się kultura pędów

R. elata, a także całe zregenerowane rośliny transformowane i nietransformowane *R. glutinosa*.

Dobrym źródłem katalpozydu, werbaskozydu i izowerbaskozydu okazały się kultury korzeni włósnikowatych *R. glutinosa*. W kulturach tych po elicytacji MeJa uzyskano kilkukrotne zwiększenie zawartości werbaskozydu, izowerbaskozydu, a także harpagidu i katalpolu w porównaniu z kontrolą.

Do osiągnięć można zaliczyć także uzyskanie roślin *R. glutinosa* transformowanych *Agrobacterium rhizogenes*, które charakteryzowały się wysoką biomasą i w związku z tym w przeliczeniu na roślinę, wytwarzały 4-krotnie więcej katalpolu, 12-krotnie więcej katalpozydu i 3-krotnie więcej werbaskozydu niż rośliny nietransformowane.

Ponadto, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń uzyskano po raz pierwszy kultury pędów nietransformowanych i transformowanych *R. glutinosa* intensywnie rosnące w bioreaktorze rozpyłowym. Współczynniki mnożenia pędów w tych warunkach były 1,6 - 2-krotnie wyższe w porównaniu z kulturami tych pędów prowadzonych w szklanych słoikach lub probówkach.

Ponadto, po raz pierwszy określono właściwości przeciwpłytkowe i antyoksydacyjne dla ekstraktów uzyskanych z roślin *R. glutinosa* w testach *in vitro* z użyciem ludzkiego osocza i płytek krwi z dobrymi efektami, czyniąc je potencjalnym źródłem związków stosowanych w chorobach układu krwionośnego lub nowotworowych, które jak wiadomo powstają w wyniku stresu oksydacyjnego.

5. Piśmiennictwo cytowane

An SJ, Pae HO, Oh GS, Choi BM, Jeong S, Jang SI, Oh H, Kwon TO, Song CF, Chung HT. 2002. Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 productions and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol* 2: 1173-1181.

Angiosperm Phylogeny Group 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161:105-121.

Chang IM. 1998. Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine. *Res Comm Mol Path Pharmacol* 102: 189-204.

Chetana R, Ramawat KG. 2009. Elicitor induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Plant Biotechnol Rep* 3: 135-138.

de Costa F, Alves Yendo AC, Fleck JD, Gosmann G, Fett-Neto AG. 2013. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. *Plant Physiol Biochem* 66: 56-62.

d'Onofrio C, Cox A, Davis Ch, Boss PK. 2009. Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates. *Funct Plant Biol* 36: 323-338.

Estrada-Zúñiga MF, Cruz-Sosa F, Rodriguez-Monroy M, Verde-Calvo JR, Vernon-Carter EJ. 2009. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 97: 39-47.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 1551-1558.

- Georgiev MI, Ivanovska N, Alipieva K, Dimitrova P, Verpoorte R. 2013. Harpagoside: from Kalahari Desert to pharmacy shelf. *Phytochemistry* 92: 8-15.
- Giri A, Narasu Lakshmi A. 2000. Transgenic hairy root: recent trends and applications. *Biotechnol Adv* 18: 1-22.
- Gómez-Aguirre YA, Zamilpa A, González-Cortazar M, Trejo-Tapia G. 2012. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Ind Crops Prod* 36: 188-195.
- Gyurkovska V, Alipieva K, Maciuk A, Dimitrova P, Ivanovska N, Haas C, Bley T, Georgiev M. 2011. Anti-inflammatory activity of Devil's claw *in vitro* systems and their active constituents. *Food Chem* 125: 171-178.
- Herbert JM, Mafrand JP, Toaubi K, Augereau JM, Fouraste I, Gleye J. 1991. Verbascoside isolated from *Lantana crumera*, an inhibitor of protein kinase C. *J Nat Prod* 54: 1595-1600.
- Kimmizibekmez H, Ariburnu E, Masullo M, Festa M, Capasso A, Yesilada E, Piacente S. 2012. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Sideritis trojana*. *Fitoterapia* 83: 130-136.
- Kupeli E, Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E. 2007. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. *J Ethnopharmacol* 110: 444-450.
- Larkin PJ, Snowcroft WR. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60: 197-214.
- Li DQ, Bao YM, Li Y, Wang ChF, Liu Y, An LJ. 2006. Catalpol modulates the expression of Bcl-2 and Bax and attenuates apoptosis in gerbils after ischemic injury. *Brain Res* 1115: 179-185.
- Liu GC, Du HQ, Liang L. 1992. Determination of catalpol in *Rehmannia glutinosa* by HPLC. *Chin Trad Herbal Drugs* 23: 71-73.
- Lloyd G, McCown B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by the use of shoot-tip culture. *Int Plant Propag Soc* 30: 421-427.
- Malepszy S. *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2004.
- Memelink J, Verpoorte R, and Kijne W. 2001. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Sci* 6: 212-219.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Namdeo AG. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Rev* 1: 69-79.
- Oh H, Pae HO, Oh GS, Lee SY, Chai KY, Song CE, Kwon TO, Chung HT, Lee HS. 2002. Inhibition of inducible nitric oxide synthesis by catalposide from *Catalpa ovata*. *Planta Med* 68: 685-689.
- Ozawa R, Arimura G, Takabayashi J, Shimoda T, and Nishioka T. 2000. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant Cell Physiology* 41: 391-398.
- Pan J, Yuan Ch, Lin Ch, Jia Z, Zheng, R. 2003. Pharmacological activities and mechanisms of natural phenylpropanoid glycosides. *Pharmazie* 58: 767-775.
- Pennacchio M. 2005 Traditional Australian Aboriginal bush medicine. *Herbal Gram* 65: 38-44.
- Pettit GR, Numata A, Takemura T, Ode RH, Narula AS, Schmidt JM, Cragg GM, Pase CP. 1990. Antineoplastic agents, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. *J Nat Prod* 53: 456-458.
- Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. 2000. The pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing, China: Chemical Industry Publishing House. 1, 94.
- Russowski D, Maurmann N, Rech SB, Fett-Nato AG. 2013. Improved production of bioactive valepotriates in whole-plant liquid cultures of *Valeriana glechomifolia*. *Industrial Crops and Products* 46: 253-257.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11655-11660.

- Shikanga EA, Combrinck S, Regnier T. 2010. South African *Lippia* herbal infusions: total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *S Afr J Bot* 76: 567-571.
- Shilpa K, Varun K, Lakshmi BS. 2010. An alternate method of natural drug production: eliciting secondary drug production using plant cell culture. *J Plant Sci* 5: 22-247.
- Stancheva N, Weber J, Schulze J, Alipieva K, Ludwig-Müller J, Haas C, Georgiev V, Bley T, Georgiev M. 2011. Phytochemical and flow cytometric analyses of Devil's claw cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 105: 79-84.
- Tasdemir D, Brun R, Franzblan SG, Sezgin Y, Calis I. 2008. Evaluation of antiprotozoal and antimycobacterial activities of the resin glycosides and the other metabolites of *Scrophularia cryptophila*. *Phytomedicine* 15: 209-215.
- Turowska I. *Zarys zielarstwa; problemy wspolczesne*. PZWL, Warszawa, 1980. ISBN: 83-200-0323-7.
- Van der Fits L, Memelink J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297.
- Vijaya Sree N, Udajasri P, Aswani Kumar Y, Ravi Babu B, Phani Kumar Y, Vija Varma M. 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. *J Nat Prod* 3: 112-123.
- WHO (World Health Organisation). *Western Pacific Series. Medicinal plants in China*, 1989, 2, ISBN: 92 9061 102 2.
- Wysokińska H, Chmiel A. 2006. Produkcja roślinnych metabolitów w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia* 4: 124-135.
- Zhang RX, Li MX, Jia ZP. 2008. *Rehmannia glutinosa*: review of botany, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 117: 199-214.
- Zhu LLF, Wan D., Luo Y., Zhou J.L., Chen L., Xu XY. 2010. Catalpol increases brain angiogenesis and up-regulates VEGF and EPO in the rat after permanent middle cerebral artery occlusion. *Int J Biol Sci* 6: 443-453.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Cała moja droga zawodowa jest związana z biotechnologią roślin leczniczych. Zajmowałam się wyprowadzaniem różnych rodzajów kultur *in vitro*, zarówno nietransformowanych jak i poddanych genetycznej transformacji, za pomocą bakterii *A. rhizogenes*. Uzyskane kultury badano pod kątem zwiększenia ich zdolności do wytwarzania określonych związków biologicznie czynnych, zwłaszcza glikozydów sekoirydoidowych, irydooidowych i fenyloetanoidowych. Poza tym, część mojej pracy badawczej była również skoncentrowana na opracowaniu procedur wydajnego mikrorozmnażania niektórych cennych gatunków roślin leczniczych, ze szczególnym uwzględnieniem zwiększenia współczynnika mnożenia pędów, z zastosowaniem różnych systemów hodowli (kultur płynna, kultury bioreaktorowe). Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie zagranicznych posiadających IF (*Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *Biotechnology Letters*, *Plant Science*).

6.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Po rozpoczęciu Studium Doktoranckiego na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w 2000 roku wstąpiłam do zespołu p. prof. dr hab. Haliny Wysokińskiej w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej i rozpoczęłam badania nad kulturami *in vitro* tysiącznika pospolitego (*Centaurium erythraea* Rafn). W wyniku prowadzonych eksperymentów i zastosowaniu różnych technik biotechnologicznych uzyskałam kultury kalusowe, kultury organów (pędów i korzeni) niezmienionych i zmienionych genetycznie oraz zregenerowane *in vitro* rośliny *C. erythraea* (niezmienione i zmienione genetycznie) z wysoką zawartością glikozydów sekoirydoidowych (gencjopikrozydu, swerozydu, swertiamaryny). Wyniki tych badań stanowiły treść mojej pracy doktorskiej, pt. „*Centaurium erythraea* Rafn w kulturze *in vitro*”, którą obroniłam 22.10.2004 roku. Praca ta decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego uzyskała również wyróżnienie.

6.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora podjęłam pracę w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej i Botaniki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, gdzie pracowałam na stanowisku asystenta od 31.12.2004 roku do 28.02.2006 roku. Pracując we Wrocławiu zainteresowałam się kulturami *in vitro* dalekowschodnich roślin leczniczych (*Agastache rugosa*, *Lycopus lucidus*), brałam udział w organizowaniu pokoju hodowlanego oraz laboratorium roślinnych kultur *in vitro* i opiekowałam się studentami pracującymi w Studenckim Kole Naukowym działającym przy Zakładzie Biologii Farmaceutycznej i Botaniki. Rezultatem mojej pracy we Wrocławiu był współudział w zakładaniu kultur *in vitro* *Agastache rugosa* oraz *Lycopus lucidus* (kultury kalusowe, pędów bocznych oraz przybyszowych) oraz opracowanie wydajnych procedur mikrorozmnażania tych dwóch gatunków roślin leczniczych zarówno z pąków szczytowych jak i drogą organogenezy. W dalszym etapie pracy skupiłam się na opracowaniu procedury immobilizacji tkanek merystematycznych *Agastache rugosa* i *Lycopus lucidus* w otoczkach z alginianu sodu w celu przechowywania materiału pochodzącego z kultur *in vitro*, a następnie opracowaniu optymalnych warunków dla regeneracji roślin z zakapsułkowanych tkanek. Efektem tych doświadczeń było współautorstwo w dwóch publikacjach, dwóch doniesieniach zjazdowych (Załącznik nr 5) oraz opieka merytoryczna nad dwiema pracami magisterskimi.

2.10.2006 roku podjęłam pracę w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, początkowo na etacie asystenta, a od 1.11.2007 roku na stanowisku adiunkta. W mojej pracy badawczej kontynuowałam tematykę związaną z

kulturami *in vitro* *C. erythraea*. Praca nad kulturami tyśięcznika obejmowała opracowanie optymalnych warunków do wzrostu korzeni włośnikowatych, pędów nietransformowanych hodowanych w płynnym podłożu w kolbach Erlenmeyera i bioreaktorze rozpyłowym oraz produkcji sekoirydoidów w uzyskanym materiale. Ponadto, opracowałam metodę immobilizacji korzeni włośnikowatych w otoczkach z alginianu sodu w celu namnażania pędów transformowanych i uzyskania transformowanych roślin z wysoką zawartością sekoirydoidów. Ponadto, prowadziłam również badania fitochemiczne i molekularne nad kulturą pędów i roślin zregenerowanych z pąków przybyszowych *C. erythraea*. Jednocześnie z kulturami tyśięcznika, rozpoczęłam hodowlę kultur *in vitro* chińskich roślin leczniczych z rodzaju *Rehmannia*. Obiektem moich badań zostały dwie rośliny z tego rodzaju: *Rehmannia glutinosa* Libosch. oraz *R. elata* N.E. Brown ex Prain. Wyniki tych badań stanowią cykl publikacji zgłoszony do niniejszego postępowania habilitacyjnego.

6.3. Projekty badawcze

2007-2010 badania własne, Uniwersytet medyczny w Łodzi, numer 502-13-621. **Kierownik projektu: dr E. Piątczak.** Temat „Badania biotechnologiczne, fitochemiczne i biologiczne chińskich roślin leczniczych z rodzaju *Rehmannia*”.

2011-2015 środki statutowe Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej UM w Łodzi (nr 503/3-012-01/503-31-001)

6.4. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Polskie Towarzystwo Botaniczne

6.5. Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

Działalność dydaktyczna:

1. Prowadzenie ćwiczeń i wykładów z przedmiotu „Biologia z genetyką” dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja.
2. Prowadzenie ćwiczeń i wykładów z przedmiotu „Botanika farmaceutyczna” dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja.
3. Prowadzenie wykładów i seminariów z przedmiotu „Biologia i genetyka” dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Kosmetologia (studia stacjonarne i niestacjonarne).
4. Przygotowanie i prowadzenie seminariów na zajęciach fakultatywnych „Zieloni zabójcy” dla studentów II roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja

5. Przygotowanie i prowadzenie zajęć z systematyki roślin w terenie dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja
6. Przygotowanie i prowadzenie seminariów na zajęciach fakultatywnych „Roślinne metabolity w kosmetykach i aromaterapii” dla studentów IV roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja
7. Przygotowanie i prowadzenie seminariów na zajęciach fakultatywnych „Biotechnologia roślin leczniczych” dla studentów II roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja
8. Przygotowanie i prowadzenie seminariów na zajęciach fakultatywnych z przedmiotu „Biotechnologia roślin leczniczych” dla studentów IV roku Wydziału Farmaceutycznego, Kierunku Farmacja
9. Przygotowanie i prowadzenie ćwiczeń dotyczących kultur *in vitro* tkanek i organów roślinnych organizowanych dla studentów IV roku Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w roku akademickim 2003/2004 oraz 2004/2005
10. Opiekun naukowy 9 prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym, Kierunku Farmacja Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz opiekun naukowy 2 prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym, Kierunku Farmacja Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
11. Promotor jednej pracy licencjackiej na Wydziale Farmaceutycznym, Kierunku Kosmetologia Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
12. Opiekun naukowy Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (lata 2005-2007)
13. Opiekun naukowy Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (od 2008 roku)

Działalność popularyzatorska:

1. wykład pt. „Kultury *in vitro* *Centaurium erythraea* Rafn.” wygłoszony na zebraniu naukowym Polskiego Towarzystwa Botanicznego w Łodzi w 2004 roku.
2. komunikat ustny pt. “Application of hairy root cultures for production of useful secondary metabolites.” Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2008. Kraków 17-19.10.2008. Acta Biochimica Polonica Vol. 55 Supplement 4/2008 L. 2.16.

3. wykład pt: „Application of mist trickling bioreactor for organ cultures of medicinal plants” na Międzynarodowej Konferencji „Perspectives for cytostatic compounds production using biotechnological methods” zorganizowanej przez Komisję Leku Naturalnego i Biotechnologii Polskiej Akademii Nauk, Warszawa 13.04.2010.
4. wykład pt.: Biotechnologia roślin dla medycyny i farmacji – nadzieje i obawy” wygłoszony w ramach XII Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki. Łódź kwiecień 2012.
5. Brain Awareness Week 10-14.03.2014 – udział.
6. Piątczak E., Adamczyk K. (2014). *Rehmannia glutinosa* – chińskie panaceum. *Panacea* 2: 22-24.
7. Piątczak E. (2014). Tysiącznik zwyczajny – nie taki zwyczajny. *Panacea* 3: 14-15.
8. współautorstwo 17 posterów prezentowanych na 10 konferencjach krajowych i 7 międzynarodowych (Załącznik nr 5)

6.6. Recenzje

Recenzowałam prace w następujących czasopismach:

Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica – 1

Acta Physiologiae Plantarum – 3

Journal of Biologically Active Products from Nature - 1

Journal of Medicinal Plant Research – 1

Turkish Journal of Botany – 1

6.7. Nagrody

27.12.2007 Nagroda naukowa zespołowa Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi stopnia pierwszego za cykl publikacji poświęcony roślinnym kulturom *in vitro* wybranych gatunków z rodziny *Gentianaceae* i *Lamiaceae*

2015 Nagroda naukowa zespołowa Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi stopnia trzeciego za cykl publikacji „Wykorzystanie metod biotechnologicznych dla mikrorozmnażania i produkcji metabolitów wtórnych w roślinach leczniczych”

7. Współpraca naukowa krajowa

1) z dr hab. Aleksandrą Królicką prof. UG z Pracowni Badania Związków Biologicznie Czynnych Międzywydziałowego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Wynikiem tej współpracy jest wspólna

publikacja dotycząca potwierdzenia transformacji metodami molekularnymi w korzeniach włośnikowatych *R. glutinosa*.

2) z prof. dr hab. Ewą Łojkowską z Laboratorium Ochrony Roślin i Biotechnologii Międzywydziałowego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Wynikiem tej współpracy jest wspólna publikacja dotycząca korzeni transformowanych *R. glutinosa*.

3) z dr Marzeną Wielanek z Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Wynikiem tej współpracy są wspólne publikacje i doniesienia zjazdowe dotyczące zawartości metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Centaureum erythraea* i *R. glutinosa*.

4) z prof. dr hab. inż. Aleksandrem Chmielem i jego współpracownikami z Zakładu Biosyntezy Środków Leczniczych (obecnie Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej) Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wynikiem tej współpracy jest wspólna publikacja i doniesienie zjazdowe dotyczące hodowli organów *Centaureum erythraea* w bioreaktorze rozpyłowym.

5) z dr hab. prof. nadzw. Ewą Balcerczak i jej współpracownikami z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wynikiem tej współpracy jest wspólna publikacja dotycząca potwierdzenia transformacji metodami molekularnymi w roślinach *R. glutinosa*.

6) z prof. dr hab. Beatą Olas i jej współpracownikami z Zakładu Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego. Wynikiem tej współpracy są dwie wspólne publikacje i trzy doniesienia zjazdowe dotyczące właściwości biologicznych ekstraktów z roślin nietransformowanych i transformowanych *R. glutinosa*

7) z dr hab. Adamem Matkowskim i jego współpracownikami z Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wynikiem tej współpracy są dwie publikacje i dwa doniesienia zjazdowe dotyczące mikrorozmnażania i przechowywania w warunkach *in vitro* dalekowschodnich gatunków roślin leczniczych (*Agastache rugosa* i *Lycopus lucidus*).

8) z dr hab. inż. Alina Kunicką-Styczyńską jej współpracownikami z Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Wynikiem tej współpracy jest jedno doniesienie zjazdowe dotyczące właściwości przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z liści i korzeni roślin nietransformowanych i transformowanych *R. glutinosa*. W przygotowaniu jest publikacja dotycząca tej samej tematyki.

8. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowo-badawczy (jako autor i współautor) obejmuje:

1. 16 artykułów oryginalnych (IF = 20,022; MNiSW/KBN = 314 punktów), i 2 publikacje naukowe z listy MNiSW/KBN (2 punkty) bez IF.
2. Na osiągnięcie habilitacyjne składa się cykl 8 oryginalnych publikacji (**IF = 10,927; MNiSW/KBN = 185 punktów**).
3. Dwa artykuły popularnonaukowe, jedna monografia anglojęzyczna, jeden rozdział w monografii anglojęzycznej i jeden rozdział w monografii polskojęzycznej.
4. 17 doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych (10) i międzynarodowych (7).
5. **Wskaźnik impact factor wszystkich moich publikacji IF = 20,022 i 314 punktów MNiSW.**
6. **Indeks Hirscha $h = 6$.** Liczba cytowań wynosi 85 (wg bazy ISI Web of Science) i 104 (wg bazy Scopus).

Łódź, dn. 30 marca 2016

Awelina Pipkaś